

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *True experimental : Post Test Only Control Group Design*, dengan dilakukan perhitungan jumlah hepatosit yang mengalami degenerasi hidropik pada hepar tikus putih jantan (*Rattus novergicus strain wistar*).

4.2 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama 28 hari di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang.

4.3 Populasi Dan Sampel

4.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain wistar*).

4.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain wistar*) yang sesuai dengan kriteria inklusi.

4.3.3 Besar Sampel

Pada penelitian ini untuk menentukan besar sampel menggunakan penghitungan besar sampel penelitian dengan pendekatan *Resource Equation* (Arifin & Zahiruddin, 2017). Kelompok perlakuan terdiri dari 4 kelompok yaitu, satu kelompok kontrol positif, dan tiga kelompok perlakuan. Pada penelitian ini penulis menggunakan derajat kebebasan

sebesar 10 dari rentang derajat kebebasan pada analisis varian (ANOVA) yaitu 10-20.

$$DF = N - k = kn - k = k(n-1)$$

$$n = DF/k + 1$$

$$n = 10/4 + 1$$

$$n = 2,5 + 1$$

$$n = 3,5 \text{ ekor} = 4$$

Keterangan:

DF :Derajat kebebasan komponen kesalahan

N :Jumlah sampel penelitian

k :Jumlah kelompok perlakuan

n :Jumlah subjek penelitian setiap kelompok

Koreksi besar sampel untuk antisipasi *drop out*
(Sastroasmoro,2014)

$$n' = \frac{n}{(1-f)}$$

$$n' = \frac{4}{(1-0,1)}$$

$$n' = \frac{4}{0,9} = 4,4$$

$$n' = 5$$

Keterangan :

n' = besar sampel setelah koreksi antisipasi *dropout*

n = besar sampel per kelompok

f = perkiraan proporsi *drop out* 10% (0,1)

Jumlah sampel penelitian per kelompok setelah dilakukan penghitungan besar sampel dengan pendekatan *Resource Equation* adalah sebesar 4 ekor, kemudian dilakukan koreksi besar sampel untuk mengantisipasi *drop out* yang menunjukkan besar sampel yang dibutuhkan adalah 5 ekor per kelompok , sehingga total sampel penelitian dalam 4 kelompok perlakuan adalah 20 ekor.

4.3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dalam penelitian ini menggunakan teknik *Purposive Sampling* yaitu pengambilan sampel dengan sengaja agar sampel yang dipilih sesuai dengan kriteria yang diperlukan oleh penulis.

Karakteristik Sampel Penelitian

- a. Kriteria Inklusi : Tikus putih jantan galur Wistar, umur 2-3 bulan, berat badan 150-200 gram, dan sehat ditandai dengan gerakan aktif, bulu putih tebal, dan mata jernih.
- b. Kriteria Eksklusi : Tikus cacat atau sakit, tikus sudah pernah dijadikan sampel penelitian sebelumnya.
- c. Kriteria Dropout : Tikus mati atau sakit parah selama proses penelitian.

4.3.5 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis ekstrak lidah mertua (*Sansevieria trifasciata* var. *laurentii*).

2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah degenerasi hidropik pada hepar tikus putih jantan (*Rattus novergicus* strain wistar).

4.3.6 Definisi Operasional Variabel

Tabel 4.1 Definisi operasional variabel

No	Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat	Kontrol/kriteria hasil	Skala Data
1	Ekstrak Daun Lidah Mertua (<i>Sansevieria trifasciata</i> var. <i>Laurentii</i>)	Tanaman lidah mertua yang digunakan adalah tanaman lidah mertua dengan varietas <i>laurentii</i> berwarna hijau kuning yang telah di determinasi dan di ekstrak di Materia Medica Batu	Tiap dosis dalam bentuk miligram akan dibagi dengan massa jenis ekstrak. Penentuan massa jenis ekstrak dilakukan dengan alat piknometer. Jika volume sudah ditemukan diukur dengan gelas ukur dan diberikan dengan menggunakan sonde 1 kali sehari selama 21 hari	Timbangan Piknometer Gelas ukur	Ekstrak daun Lidah Mertua dengan dosis 20mg/200grB B/hari 40mg/200grB B/hari 80mg/200grB B/hari	Ordinal
2	Jumlah degenerasi hidropik pada hepar tikus putih jantan (<i>Rattus novergicus strain wistar</i>)	Degenerasi hidropik sel hepatosit hepar ditandai sel yang membesar, dengan sitoplasma berwarna bening atau pucat, serta nukleus yang terletak normal. Proses pengamatan akan dilakukan dibawah bimbingan ahli patologi anatomi Laboratorium Biomedik FK UMM	Mengamati sediaan histopatologi sel hepatosit hepar yang telah dilakukan pewarnaan <i>Hematoxilin-Eosin</i> dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x setiap sediaan diamati dalam 5 lapang pandang secara acak, kemudian dihitung jumlah sel hepatosit yang mengalami degenerasi hidropik	Mikroskop Cahaya	Data disajikan sebagai jumlah degenerasi hidropik sel hepatosit hepar dalam 5 lapang pandang (satuan) yang diamati secara acak	Rasio

4.4 Alat Dan Bahan Penelitian

4.4.1 Alat

1. Alat pemeliharaan tikus yang digunakan adalah : kandang pemeliharaan tikus, botol minum air tikus, kawat kasa penutup kandang, tempat makan serta timbangan untuk mengukur berat tikus (Perret-gentil, M. I., 2007).
2. Alat pembuatan ekstrak daun lidah mertua : Bak air, pisau/gunting, blender, gelas ukur, corong kaca, pengaduk kaca, *beaker glass*, timbangan miligram *balance*, (Laimeheriwa *et al*, 2014)
3. Alat untuk membuat larutan timbal asetat: Timbangan *electrical scale*, pengaduk (spatula) kaca, tabung reaksi, gelas ukur, *beaker glass*, corong kaca (Laimeheriwa *et al*, 2014)
4. Alat untuk pemberian ekstrak daun lidah mertua (*Sansevieria trifasciata laurentii*) dan induksi timbal asetat ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) : Sarung tangan, sonde oral 5ml, *beaker glass* (Laimeheriwa *et al*, 2014)

4.4.2 Bahan

1. Bahan untuk pemeliharaan tikus putih jantan: Makanan tikus standar (BR - 1), aquades (Perret-gentil, M. I., 2007).
2. Bahan untuk membuat ekstrak lidah mertua (*Sansevieria trifasciata laurentii*): daun lidah mertua (*Sansevieria trifasciata laurentii*), aquades, *Methanol* (Laimeheriwa *et al*, 2014)
3. Bahan untuk membuat larutan timbal asetat ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) : Air suling, kristal timbal asetat ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) (Laimeheriwa *et al*, 2014)

4.5 Dasar Penentuan Dosis

4.5.1 Dosis Timbal

Dosis timbal menggunakan dosis penelitian yang digunakan oleh penelitian Ahmed S.Hegazy & Usama A. Fouad (2014) sebesar 130 mg/kgBB, dosis kemudian diubah untuk 200grBB/hari sesuai dengan berat tikus yang dijadikan sebagai sampel penelitian menjadi 26 mg/200grBB. Timbal dilarutkan dalam 1 ml aquades kemudian diberikan secara oral dengan menggunakan sonde.

4.5.2 Dosis Ekstrak Lidah Mertua (*Sansevieria trifasciata* var. *laurentii*)

Dasar penghitungan dosis ekstrak lidah mertua (*Sansevieria trifasciata* var. *laurentii*) adalah penelitian terdahulu tentang efek hepatoprotektif ekstrak daun lidah mertua dengan induksi CCL₄ yaitu sebesar 200 mg/kgbb (Ikewuchi CC,2012a; Ikewuchi CC 2012b). Dalam penelitian tersebut ekstrak daun lidah mertua dalam dosis tersebut terbukti memiliki efek hepatoprotektif bagi hepar. Dosis 200mg/kgbb kemudian diubah menjadi dosis untuk 200grbb/hari sesuai dengan berat tikus yang digunakan sebagai sampel penelitian, sehingga dosis yang dibutuhkan pada 200grbb/ hari adalah sebesar 40 mg/200grBB. Untuk menentukan variasi dosis pada penelitian ini akan menggunakan rumus variasi dosis $1/2n$, n , dan $2n$.

Dosis ekstrak lidah mertua (*Sansevieria trifasciata* var. *laurentii*) pada penelitian ini yaitu:

Dosis 1 : 20 mg/200grBB/hari

Dosis 2 : 40 mg/200grBB/hari

Dosis 3 : 80 mg/200grBB/hari

Tiap dosis akan dibagi dengan massa jenis ekstrak. Penentuan massa jenis ekstrak dilakukan dengan alat piknometer, yang akan dimasukkan ke dalam rumus

$$\text{Massa Jenis } (\rho) = \frac{\text{Massa Ekstrak}}{\text{Volume Ekstrak}}$$

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Proses Adaptasi

Proses adaptasi hewan coba dalam kandang pada hari ke-1 sampai hari ke-7 dengan tujuan agar tikus menyesuaikan diri terhadap lingkungan yang baru. Selama adaptasi tikus diberikan pakan standar BR-1 yang mengandung air 12%, protein kasar 20-22%, lemak kasar $\geq 5\%$, abu $\leq 7,5\%$, Ca 0,9-1,2%, P 0,6-0,8%, coccidiostat positif, antibiotika positif sebanyak 20 gr/hari serta minum *ad libitum* (Alexandru I, 2011).

4.6.2 Pembagian Kelompok Dan Perlakuan Tikus

Setelah diadaptasikan selama 1 minggu, tikus ditimbang berat badannya. Dua belas ekor tikus putih (*Rattus norvegicus strain wistar*) jantan dibagi menjadi 4 kelompok dan tiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus yang masing-masing kelompok ditempatkan di tempat atau kandang terpisah.

- a. Kontrol positif : Diberi pakan standar BR-1 sebanyak 20 gr/hari/tikus serta minum *ad libitum* pada hari ke-8 sampai hari ke-28. selama 3 minggu yaitu pada hari ke-8 sampai hari ke-28 diberikan timbal asetat sebanyak 26 mg/200grBB/hari dan aquades dengan sonde oral.
- b. Kelompok 1 : Diberi pakan standar BR-1 sebanyak 20 gr/hari/tikus serta minum *ad libitum* pada hari ke-8 sampai hari

ke-28. Pada hari ke-8 sampai hari ke-28 diberikan timbal asetat sebanyak 26 mg/200grBB/hari dan ekstrak lidah mertua (*Sansevieria trifasciata* var. *laurentii*) 20 mg/200grBB/hari dengan sonde oral.

- c. Kelompok 2 : Diberi pakan standar BR-1 sebanyak 20 gr/hari/tikus serta minum *ad libitum* pada hari ke-8 sampai hari ke-28. Pada hari ke-8 sampai hari ke-28 diberikan timbal asetat sebanyak 26mg/200grBB/hari dan ekstrak lidah mertua (*Sansevieria trifasciata* var. *laurentii*) 40 mg/200grBB/hari dengan sonde oral.
- d. Kelompok 3 : Diberi pakan standar BR-1 sebanyak 20 gr/hari/tikus serta minum *ad libitum* pada hari ke-8 sampai hari ke-28. Pada hari ke-8 sampai hari ke-28 diberikan timbal asetat sebanyak 26 mg/200grBB/hari dan ekstrak lidah mertua (*Sansevieria trifasciata* var. *laurentii*) 80 mg/200grBB/hari dengan sonde oral.

Pada hari ke-29, semua tikus dimatikan.

4.6.3 Pembuatan Ekstrak Daun Lidah Mertua

Pembuatan serbuk simplisia lidah mertua adalah dengan mencuci bersih dibawah air mengalir, ditiriskan, dan dirajang kemudian ditimbang berat basahanya sebanyak 3.500 g, yang kemudian dikeringkan selama 10 hari dan dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan oven pada suhu 40°C, selanjutnya ditimbang berat keringnya. Simplisia lidah mertua

dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan *mesh* 200 sehingga diperoleh serbuk simplisia (Laimeheriwa *et al*, 2014).

Proses ekstraksi dilakukan selama 5 hari dengan cara maserasi, dimana sebanyak 300 g serbuk simplisia lidah mertua dimasukkan dalam wadah kemudian direndam dengan menggunakan pelarut methanol 10.500 ml dan ditutup dengan alumunium foil selama 3 hari. Dilakukan pengadukan setiap hari kemudian disaring menggunakan kertas saring, maka diperoleh filtrat 1 dan ampas 1. Ampasnya direndam lagi dengan methanol 10.500 ml selama 2 hari. Dilakukan pengadukan setiap hari dan disaring lagi menggunakan kertas saring, maka diperoleh filtrat 2 dan ampas 2. Selanjutnya filtrat 1 dan filtrat 2 dicampur menjadi satu dan diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 70°C dan dilanjutkan dengan pengentalan (Laimeheriwa *et al*, 2014).

4.6.4 Pembuatan Larutan Timbal Asetat ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$)

Kristal timbal asetat dilarutkan dengan 1 ml aquades di dalam *beaker glass* yang sudah ditera, kemudian diaduk hingga larutan homogen. (Laimeheriwa *et al*, 2014)

4.6.5 Pembedahan Tikus Dan Pengambilan Sampel Organ

Pembedahan pada semua hewan coba tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain wistar dilakukan pada hari ke 29. Prosedur pembedahan tikus terdiri dari tiga tahap :

1. Persiapan

Disiapkan pot organ yang sudah diberi label berdasarkan nomor tikus yang akan dibedah. Pot organ diisi larutan *Buffer Neutral Formalin* 10% untuk fiksasi organ (Santosa, 2009; Suhita, Sudira & Bagus, 2013).

2. Proses Anastesi dan Pembedahan

Hewan coba dimasukkan ke dalam toples kaca yang sebelumnya sudah diberi kapas yang mengandung kloroform untuk di anastesi, proses dilakukan satu persatu dengan harapan tikus mati dengan dosis kloroform 0,67 ml/hewan coba selama 60 detik yang dihitung menggunakan *stopwatch*. Hewan coba yang sudah mati dipastikan dengan tidak ditemukan tanda pernapasan, pergerakan pada tubuh tikus,serta tidak adanya respon saat diberikan rangsangan nyeri. Pada tikus yang masih menunjukkan pergerakan, pernapasan, dan respon nyeri dilakukan prosedur *cervical dislocation* (Parkinson *et al.*, 2011).

Tikus yang sudah mati diletakkan pada meja paraffin dan keempat kaki tikus difiksasi menggunakan jarum pentul. Tikus dibedah mulai dari bagian perut dengan gunting bengkok. Organ diambil, kemudian dicuci menggunakan aquades berulang-ulang hingga bersih dari darah. Kemudian dicuci dengan NaCl 0,9% berulang-ulang. Organ ditiriskan di atas kertas saring, lalu

dimasukkan ke dalam pot berisi larutan *Buffer Neutral Formalin* 10% (Santosa, 2009; Suhita, Sudira & Bagus, 2013).

3. Sanitasi

Organ tikus yang tidak terpakai dimasukkan ke dalam kantong plastik. Kantong plastik yang berisi sisa organ kemudian dikubur. Sampah lain berupa plastik, kertas, dan lain-lain yang tidak berhubungan dengan organ dibuang dalam kantong plastik tersendiri. Area kerja tempat pembedahan dibersihkan dengan sabun dan disemprot alkohol (Santosa, 2009).

4.6.6 Pembuatan Preparat Histologi

1. Memotong Jaringan Organ

Setelah jaringan organ terfiksasi, jaringan tersebut ditiriskan kemudian dipotong menggunakan pisau *scalpel* dengan ketebalan 0,3 - 0,5 mm dan disusun di dalam kaset penyimpanan jaringan (*tissue cassette*). Sejumlah *tissue cassette* dimasukkan ke dalam keranjang khusus (Muntiha, 2001; Suhita, Sudira & Bagus, 2013).

2. Proses Dehidrasi

Keranjang khusus yang berisi jaringan organ dimasukkan ke dalam mesin prosessor otomatis. Kemudian dilakukan dehidrasi menggunakan alkohol konsentrasi bertingkat. Alkohol 70%, 80%, 90%, alkohol absolut I, alkohol absolut II masing-masing 2 jam. Selanjutnya keranjang dikeluarkan (Muntiha, 2001; Suhita, Sudira & Bagus, 2013).

3. Vakum

Menghilangkan udara dari jaringan menggunakan mesin vakum yang berisi tabung untuk menyimpan keranjang selama 30 menit. Kemudian keranjang diangkat, *tissue cassette* di keluarkan dan disimpan dalam suhu 60°C (Muntiha, 2001; Suhita, Sudira & Bagus, 2013).

4. Mencetak Blok Parafin

Jaringan dimasukkan ke dalam cetakan berbahan *stainless steel* yang dihangatkan di atas api bunsen. Parafin cair dituangkan ke dalam jaringan hingga seluruh jaringan terendam parafin. Parafin dibiarkan membeku di atas mesin pendingin. Kemudian blok parafin dilepas dari cetakan dan disimpan di suhu -20°C (Muntiha, 2001; Suhita, Sudira & Bagus, 2013).

5. Memotong Blok Jaringan

Blok-blok parafin dipotong setebal 5-6 µm menggunakan mikrotom. Hasil potongan diletakkan di kaca objek selanjutnya dimasukkan ke dalam inkubator suhu 60°C untuk meregangkan agar jaringan tidak terlipat (Muntiha, 2001; Suhita, Sudira & Bagus, 2013).

6. Menyiapkan larutan untuk pewarnaan

Preparat dikeluarkan dari inkubator. Mempersiapkan larutan hematoksilin dan eosin yang akan digunakan untuk pewarnaan (Muntiha, 2001; Suhita, Sudira & Bagus, 2013).

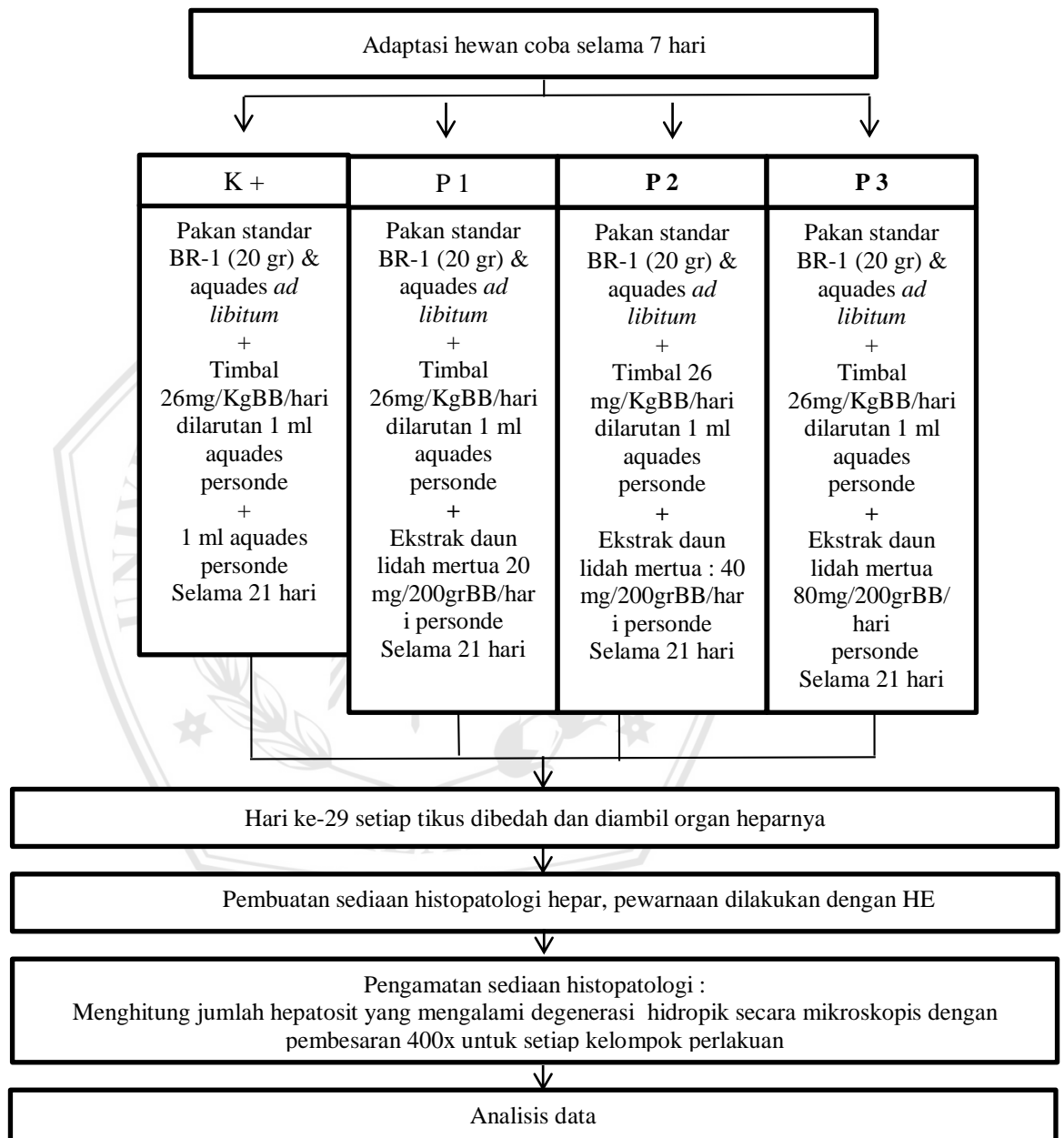
7. Proses Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin

Preparat yang akan diwarnai diletakkan pada rak khusus. Kemudian preparat dicelupkan ke dalam larutan berikut secara berurutan :

- a. Xylol
- b. Xylol
- c. Alkohol Absolut
- d. Alkohol 90%
- e. Alkohol 80%
- f. Dibilas dengan air keran
- g. Larutan hematoksilin
- h. Dibilas dengan air keran
- i. Larutan pembiru
- j. Air keran
- k. Larutan eosin
- l. Dibilas dengan air keran
- m. Alkohol 80%
- n. Alkohol 90%
- o. Alkohol absolut
- p. Xylol
- q. Xylol
- r. Xylol

Selanjutnya preparat diangkat dan ditetesi satu tetes cairan perekat. Kemudian preparat ditutup dengan kaca penutup (Muntiha, 2001; Suhita, Sudira & Bagus, 2013).

4.7 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.8 Analisis Data

Data-data dalam penelitian ini dianalisis dengan uji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu. Kemudian, jika distribusi data normal dan homogen, data dianalisis menggunakan uji *One Way Anova*, uji *Post-Hoc Bonferroni*, dan Uji Regresi Linier.

Uji normalitas bertujuan untuk mengetahui sebaran data normal atau tidak dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Sebaran data dikatakan normal apabila $\text{sig} > 0,05$. Apabila sebaran data tidak normal, maka dilakukan transformasi data terlebih dahulu. Apabila hasil transformasi data normal, dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* dan uji *Post-Hoc Bonferroni*. Apabila sebaran data tetap tidak normal, maka menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan uji *Post-Hoc Mann-Whitney*.

Uji homogenitas bertujuan untuk mengetahui varian atau kehomogenan data yang diperoleh dengan menggunakan uji *Levene Test*. Data dikatakan homogen apabila $\text{sig} > 0,05$.

1. Uji *One Way Anova*

Apabila sebaran data normal dan data homogen, maka dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*. Untuk mengetahui terdapat adanya pengaruh ekstrak lidah mertua terhadap jumlah hepatosit yang mengalami degenerasi hidropik pada hepar yang di induksi oleh timbal. Apabila diperoleh sebaran data tidak normal dan data tidak homogen, maka dilanjutkan dengan uji non parametrik yaitu uji *Kruskal-Wallis*.

2. Uji *Post-Hoc Bonferroni*

Uji *Post-Hoc Bonferroni* membuktikan adanya perbedaan bermakna atau signifikan antara variabel. Apabila varian data tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc Games-Howell*

3. Uji Regresi Linier

Uji Regresi Linier dilakukan untuk melihat hubungan antara variabel agar dapat mengetahui besar pengaruh dan memprediksi dosis ekstrak daun lidah mertua (*Sansevieria trifasciata* var. *laurentii*) yang berpengaruh terhadap jumlah hepatosit yang mengalami degenerasi hidropik pada hepar yang diinduksi timbal.

Proses perhitungan dilakukan dengan bantuan perangkat lunak komputer program SPSS *for windows*.

4.9 Jadwal Penelitian

Tabel 4.1 Jadwal Penelitian

No	Jenis Kegiatan	Minggu				
		1	2	3	4	5
1	Pengurusan Ethical Clearance					
2	Persiapan tikus dan tanaman lidah mertua					
3	Proses adaptasi bagi tikus					
4	Pembuatan ekstrak tanaman lidah mertua					
5	Pemberian ekstrak lidah mertua					
6	Induksi timbal asetat					
7	Pembuatan preparat histopatologi					
8	Pengamatan gambaran histopatologi hepar tikus					
9	Analisa data					
10	Konsultasi dan revisi akhir					

